



①9 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**
⑩ **DE 195 48 222 A 1**

⑳ Aktenzeichen: 195 48 222.0
㉔ Anmeldetag: 22. 12. 95
㉕ Offenlegungstag: 26. 6. 97

⑤① Int. Cl. 6:
C 12 N 15/67

C 12 N 15/69
C 12 N 15/77
C 12 N 15/31
C 12 N 1/00
C 12 N 1/21
C 07 K 14/34
C 12 P 13/08
C 07 C 229/26
// (C 12 N 15/77, C 12 R
1:15) (C 12 N 15/31,
C 12 R 1:15) (C 12 N
1/21, C 12 R 1:15)
(C 12 P 13/08, C 12 R
1:15)

DE 195 48 222 A 1

⑦① Anmelder:
Forschungszentrum Jülich GmbH, 52428 Jülich, DE

⑦② Erfinder:
Vrljic, Marina, 52428 Jülich, DE; Eggeling, Lothar,
Dr., 52428 Jülich, DE; Sahm, Hermann, Prof., 52428
Jülich, DE

⑤⑥ Entgegenhaltungen:
J. Bacteriol. Vol. 177, S. 4021-4027, 1995;

Prüfungsantrag gem. § 44 PatG ist gestellt

⑤④ Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren durch gesteigerte Aktivität von Exportcarriern

⑤⑦ Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren, bei dem die Exportcarrieraktivität und/oder die Exportgenexpression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Erfindungsgemäß wurde gefunden, daß für den Export von Aminosäuren jeweils nur ein einziges, spezifisches Gen verantwortlich ist, so daß erfindungsgemäß erstmals ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren zur Verfügung gestellt wird, bei dem gezielt die Exportgenexpression und/oder die Exportcarrieraktivität eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Die aus dieser Verfahrensweise resultierende, gesteigerte Expression bzw. Aktivität des Exportcarriers führt zu einer erhöhten Sekretionsrate, so daß der Transport der entsprechenden Aminosäure erhöht ist.

DE 195 48 222 A 1

DE 195 48 222 A1

Beschreibung

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren gemäß den Ansprüchen 1 bis 20, Exportgene nach Anspruch 21 bis 26, Regulatorgene nach Anspruch 27 und 28, Genstrukturen gemäß den Ansprüchen 29 und 30, Vektoren nach Anspruch 31 bis 33, transformierte Zellen nach Anspruch 34 bis 40, Membranproteine gemäß Anspruch 41 und 42 sowie Verwendungen nach Anspruch 43 bis 48.

Aminosäuren sind von großem wirtschaftlichen Interesse, wobei die Verwendung von Aminosäuren vielfältig ist: So wird z. B. L-Lysin, wie auch L-Threonin, und L-Tryptophan als Futtermittelzusatz benötigt, L-Glutamat als Gewürzzusatz, L-Isoleucin und L-Tyrosin in der pharmazeutischen Industrie, L-Arginin und L-Isoleucin als Medikament, oder L-Glutamat und L-Phenylalanin als Ausgangssubstanz zur Synthese von Feinchemikalien.

Eine bevorzugte Methode zur Herstellung dieser verschiedensten Aminosäuren ist die biotechnologische Herstellung mittels Mikroorganismen; denn auf diese Weise wird direkt die biologisch wirksame und optisch aktive Form der jeweiligen Aminosäure erhalten, und es können einfache und preisgünstige Rohstoffe eingesetzt werden. Als Mikroorganismen werden z. B. *Corynebacterium glutamicum* und seine Verwandten ssp. *flavum* und ssp. *lactofermentum* (Liebl et al., Int J System Bacteriol (1991) 41: 255–260) wie auch *Escherichia coli* und verwandte Bakterien eingesetzt.

Diese Bakterien produzieren die Aminosäuren normalerweise aber nur in der zum Wachstum benötigten Menge, so daß also keine überschüssigen Aminosäuren gebildet und ausgeschieden werden. Dies ist darin begründet, daß in der Zelle die Biosynthese der Aminosäuren in vielfacher Weise kontrolliert wird. Folglich sind bereits verschiedenste Verfahren bekannt, um die Produktbildung durch Ausschaltung der Kontrollmechanismen zu steigern. Bei diesen Prozessen werden z. B. Aminosäureanaloga eingesetzt, um die effektive Regulation der Biosynthese auszuschalten. So ist ein Verfahren beschrieben, bei dem *Corynebacterium*-Stämme benutzt werden, die gegen L-Tyrosin- und L-Phenylalaninanaloga resistent sind (JP 19037/1976 und 39517/1978). Ebenso sind Verfahren beschrieben, bei denen gegenüber L-Lysin- oder auch L-Threoninanaloga resistente Bakterien eingesetzt werden, um die Kontrollmechanismen zu überwinden (EP 0 205 849 B1, UK Patent Application GB 2 152 509 A).

Weiterhin sind auch durch rekombinante DNA-Techniken konstruierte Mikroorganismen bekannt, bei denen ebenfalls die Regulation der Biosynthese aufgehoben ist, indem die Gene, die für die nicht mehr feedback-inhibierbaren Schlüsselenzyme kodieren, kloniert und exprimiert werden. So ist z. B. ein rekombinantes, L-Lysin produzierendes Bakterium mit plasmidkodierter, feedback-resistenter Aspartatkinase bekannt (EP 0 381 527). Ebenso ist ein rekombinantes, L-Phenylalanin produzierendes Bakterium mit feedback-resistenter Prephenatdehydrogenase beschrieben (JP 124375/1986, EP 0 488 424). Darüber hinaus wurden auch durch Überexpression von Genen, die nicht für feedback-sensitive Enzyme der Aminosäuresynthese codieren, erhöhte Aminosäureausbeuten erreicht. So wird z. B. die Lysinbildung durch erhöhte Synthese der Dihydrodipicolinatsynthase verbessert (EP 0 197 335). Ebenso wird durch erhöhte Synthese der Threonindehydratase eine verbesserte Threoninbildung erreicht (EP 0 436 886 A1).

Weitere Versuche zur Erhöhung der Aminosäureproduktion zielen auf eine verbesserte Bereitstellung der zellulären Primärmetabolite des Zentralstoffwechsels. So ist bekannt, daß die durch rekombinante Techniken erreichte Überexpression der Transketolase eine verbesserte Produktbildung von L-Tryptophan, L-Tyrosin, oder L-Phenylalanin ermöglicht (EP 0 600 463 A2). Weiterhin führt die Reduktion der Phosphoenolpyruvatcarboxylase-Aktivität in *Corynebacterium* zu verbesserter Bildung aromatischer Aminosäuren (EP 0 333 1145).

Diese vielfältigen Versuche zur Produktivitätssteigerung sind insgesamt darauf gerichtet, die Limitation der cytosolischen Synthese der Aminosäuren zu überwinden. Als eine weitere Limitation kommt grundsätzlich aber auch der Export der im Zellinneren gebildeten Aminosäuren ins Kulturmedium in Betracht. Daher gibt es vereinzelte Ansätze, diesen Export und damit die Wirtschaftlichkeit der Aminosäureproduktion zu verbessern. So hat man die Zellpermeabilität bei *Corynebacterium* durch Biotinmangel, Detergenz- oder Penicillinbehandlung erhöht. Diese Ausschleusehilfen waren jedoch ausschließlich bei der Glutamatproduktion erfolgreich, während die Synthese anderer Aminosäuren auf diese Weise nicht verbessert werden konnte. Auch sind Bakterienstämme entwickelt worden, bei denen die Aktivität des Sekretionssystems aufgrund chemischer oder physikalischer Mutation erhöht ist. Es wurde dadurch beispielsweise ein *Corynebacterium glutamicum*-Stamm erhalten, der sich durch eine verbesserte Sekretionsaktivität insbesondere für die L-Lysinproduktion eignet (DE 42 03 320).

Insgesamt zeichnen sich alle bisher durchgeführten Versuche zur Erhöhung der Sekretion zellintern gebildeter Aminosäuren dadurch aus, daß ein erhöhter Efflux von Aminosäuren aufgrund der gewählten ungerichteten bzw. unspezifischen Methoden nur durch Zufall erreicht werden konnte. Einzig in der Deutschen Patentanmeldung No. 195 23 279.8-41 ist ein Verfahren beschrieben, das es erlaubt, die Sekretion zellintern gebildeter Aminosäuren ganz gezielt zu erhöhen, indem die Expression von für den Import von Aminosäuren kodierenden Genen erhöht wurde. Die dieser Vorgehensweise zugrundeliegende Erkenntnis, daß die Zelle Importproteine für den Export von Aminosäuren verwendet wie auch die Tatsache, daß Mikroorganismen von Natur aus keine überschüssigen Aminosäuren bilden und ausscheiden, legt die Vermutung nahe, daß für den Aminosäuretransport spezifische Exportgene bzw. -proteine gar nicht existieren, sondern daß aus der Zelle die Aminosäuren über andere Exportsysteme exkretiert werden.

Die bisher bekannten Exportsysteme exportieren giftige Metallionen, toxische Antibiotika und höhermolekulare Toxine. Diese Exportsysteme sind relativ komplex aufgebaut: In der Regel sind Membranproteine der Cytoplasmamembran beteiligt, die jedoch nur eine Teilreaktion des Exports bewirken, so daß vermutlich für den Transport zusätzliche, extracytoplasmatische Hilfsproteine erforderlich sind (Dinh, T. et al., A family of extracytoplasmic proteins that allow transport of large molecules across the outer membranes of gram-negative bacteria. J. Bacteriol. 1994, 176: 3825–3831). Desweiteren ist bekannt, daß bei dem sec-abhängigen Exportsys-

DE 195 48 222 A1

stem für extrazelluläre Proteine mindestens 6 verschiedene Proteinkomponenten für den Export essentiell sind. Dieser Stand der Technik legt die Vermutung nahe, daß ebenso die für den Export von Aminosäuren zuständigen, aber bislang unbekannten Systeme aus mehreren Proteinkomponenten bestehen bzw. mehrere Gene für den Export von Aminosäuren zuständig sind. Hinweis dafür könnten die von Vrljic et al. beschriebenen (J Bacteriol (1995) 177:4021—4027) verschiedenen, im Lysinexport defekten Mutanten sein.

Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß für den Export von Aminosäuren jeweils nur ein einziges, spezifisches Gen verantwortlich ist, so daß erfindungsgemäß erstmals ein Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren zur Verfügung gestellt wird, bei dem gezielt die Exportgen-Expression und/oder die Exportcarrier-Aktivität eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird. Die aus dieser Verfahrensweise resultierende, gesteigerte Expression bzw. Aktivität des Exportcarriers führt zu einer erhöhten Sekretionsrate, so daß der Export der entsprechenden Aminosäure erhöht ist. Auch akkumulieren derart veränderte Mikroorganismen einen erhöhten Anteil der entsprechenden Aminosäure im Kulturmedium.

Zur Erhöhung der Exportcarrier-Aktivität wird insbesondere die endogene Aktivität eines Aminosäure-produzierenden Mikroorganismus erhöht. Eine Erhöhung der Enzymaktivität kann beispielsweise erreicht werden, indem durch Veränderung des katalytischen Zentrums ein erhöhter Substratumsatz erfolgt oder indem die Wirkung von Enzyminhibitoren aufgehoben wird. Auch kann eine erhöhte Enzymaktivität durch Erhöhung der Enzymsynthese, beispielsweise durch Genamplifikationen oder durch Ausschaltung von Faktoren, die die Enzym-Biosynthese reprimieren, hervorgerufen werden. Die endogene Exportcarrier-Aktivität wird vorzugsweise durch Mutation des endogenen Exportgens erhöht. Derartige Mutationen können entweder nach klassischen Methoden ungerichtet erzeugt werden, wie beispielsweise durch DV-Bestrahlung oder mutationsauslösenden Chemikalien, oder gezielt mittels gentechnologischer Methoden wie Deletion(en), Insertion(en) und/oder Nukleotidaustausch(e). Die Exportgen-Expression wird durch Erhöhen der Genkopienzahl und/oder durch Verstärkung regulatorischer Faktoren, die die Exportgen-Expression positiv beeinflussen, erhöht. So kann eine Verstärkung regulatorischer Elemente vorzugsweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem insbesondere die Transkriptionssignale erhöht werden. Dies kann beispielsweise dadurch erfolgen, daß durch Veränderung der dem Strukturgen vorgeschalteten Promotorsequenz der Promotor in seiner Wirksamkeit erhöht wird oder indem der Promotor komplett durch wirksamere Promotoren ausgetauscht wird. Auch kann eine Verstärkung der Transkription durch entsprechende Beeinflussung eines dem Exportgen zugeordneten Regulatorgens erfolgen, wie weiter unten ausgeführt wird. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der m-RNA verbessert wird.

Zur Erhöhung der Genkopienzahl wird das Exportgen in ein Genkonstrukt bzw. in einen Vektor eingebaut, vorzugsweise in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl. Das Genkonstrukt enthält insbesondere dem Exportgen zugeordnete regulatorische Gensequenzen, vorzugsweise solche, die die Genexpression verstärken. Die regulatorischen Gensequenzen weisen insbesondere eine für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz bzw. eine Nukleotidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz auf. Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen umfassen insbesondere funktionelle Derivate, die durch Deletion(en), Insertion(en) und/oder Substitution(en) von Nukleotiden aus entsprechenden Sequenzen erhältlich sind, wobei aber die Regulatorprotein-Aktivität bzw. -Funktion erhalten bleibt oder sogar erhöht ist. So kann durch Mutation der regulatorischen Gensequenz die Effektivität der Bindung des Regulatorproteins an die DNA des zu regulierenden Exportgens so beeinflusst sein, daß dadurch die Transkription verstärkt und somit die Genexpression erhöht ist. Desweiteren können dem Exportgen als regulatorische Sequenzen aber auch sog. "enhancer" zugeordnet sein, die über eine verbesserte Wechselwirkung zwischen RNA-Polymerase und DNA ebenfalls eine erhöhte Exportgen-Expression bewirken.

Für den Einbau des Exportgens in ein Genkonstrukt wird das Exportgen vorzugsweise aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung *Corynebacterium* isoliert, und mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismen-Stamm, insbesondere *Corynebacterium*, transformiert. Die Isolierung und Transformation des entsprechenden Transportgens erfolgt nach gängigen Methoden: Im Falle der Isolierung und Klonierung eines Transportgens aus *Corynebacterium* eignet sich beispielsweise die Methode der homologen Komplementation einer exportdefekten Mutante (J Bacteriol (1995) 177: 4021—4027). Falls keine direkte Klonierung des Strukturgens möglich ist, kann zunächst auch die Insertion von Vektorsequenzen in das Transportgen erfolgen, um es dann über "plasmid-rescue" in Form inaktiver Fragmente zu isolieren. Für das erfindungsgemäße Verfahren eignen sich insbesondere Gene aus *C. glutamicum* ATCC 13032 oder *C. glutamicum* ssp. *flavum* ATCC 14067 oder auch *C. glutamicum* ssp. *lactofermentum* ATCC 13869. Nach Isolierung der Gene und deren in vitro-Rekombination mit bekannten Vektoren (Appl Env Microbiol (1989) 55: 684—688; Gene 102 (1991) 93—98), erfolgt die Transformation in die Aminosäure-produzierenden Stämme durch Elektroporation (Liebl et al. (1989) FEMS Microbiol Lett 65: 299—304) oder Konjugation (Schäfer et al. (1990) J Bacteriol 172: 1663—1666). Für die Übertragung werden vorzugsweise Vektoren mit niedriger Kopienzahl eingesetzt. Als Wirtszellen werden vorzugsweise solche Aminosäureproduzenten eingesetzt, die in der Synthese der entsprechenden Aminosäuren dereguliert sind und/oder die einen erhöhten Anteil an Zentralstoffwechselmetaboliten enthalten.

Nach Isolierung sind Exportgene mit Nukleotidsequenzen erhältlich, die für die in Tabelle 3 angegebene Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen kodieren bzw. die die Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz aufweisen. Auch hier umfassen Allelvariationen bzw. gleichwirkende DNA-Sequenzen insbesondere funktionelle Derivate im oben für die regulatorischen Sequenzen angegebenen Sinne. Diese Exportgene werden vorzugsweise im erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt.

DE 195 48 222 A1

Dem Exportgen mit oder ohne vorgeschaltetem Promotor bzw. mit oder ohne zugeordnetem Regulatorgen können ein oder mehrere DNA-Sequenzen vor- und/oder nachgeschaltet sein, so daß das Gen in einer Genstruktur enthalten ist.

Durch Klonierung von Exportgenen sind Plasmide bzw. Vektoren erhältlich, die das Exportgen enthalten und wie bereits oben erwähnt — zur Transformation eines Aminosäure-Produzenten geeignet sind. Die durch Transformation erhältlichen Zellen, bei denen es sich vorzugsweise um transformierte Zellen von *Corynebacterium* handelt, enthalten das Gen in replizierbarer Form, d. h. in zusätzlichen Kopien auf dem Chromosom, wobei die Genkopien durch homologe Rekombination an beliebigen Stellen des Genoms integriert werden, und/oder auf einem Plasmid bzw. Vektor.

Es sind eine Vielzahl von Sequenzen bekannt, die für Membranproteine unbekannter Funktion kodieren. Durch die erfindungsgemäße Bereitstellung von Exportgenen, wie beispielsweise des Exportgens mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2, bzw. der entsprechenden Exportproteine, wie z. B. das mit der Aminosäuresequenz gemäß Tabelle 1, können nunmehr Membranproteine, deren Funktion der Transport von Aminosäuren ist, durch Sequenzvergleich identifiziert werden. Das damit identifizierte Exportgen kann anschließend zur Verbesserung der Aminosäureproduktion nach dem erfindungsgemäßen Verfahren eingesetzt werden.

Die aus dem Stand der Technik bekannten Membranproteine besitzen in der Regel 12, zum Teil auch 4 transmembrane Helices. Es wurde nunmehr überraschenderweise gefunden, daß die für den Export von Aminosäuren zuständigen bzw. geeigneten Membranproteine 6 transmembrane Helices aufweisen (vgl. z. B. die in Tabelle 3 aufgeführte Aminosäuresequenz eines Exportproteins, bei der die 6 transmembranen Bereiche durch Unterstrichen kenntlich gemacht sind). Damit liegt hier eine bisher noch nicht beschriebene und somit neue Klasse von Membranproteinen vor.

Ausführungsbeispiele

a) Klonierung eines Exportgens und Klonierung eines Regulators aus *Corynebacterium glutamicum*

Chromosomale DNA aus *C. glutamicum* R127 (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299—304) wurde, wie bei Scharzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84—87) beschrieben, isoliert. Diese wurde mit dem Restriktionsenzym Sau3A gespalten und durch Saccharose-Gradienten-Zentrifugation, wie bei Sambrook et al. (Molecular Cloning, A laboratory manual (1989) Cold Spring Harbour Laboratory Press) beschrieben, aufgetrennt. Die einzelnen Fraktionen wurden gelelektrophoretisch auf ihre Größe hin analysiert und die Fraktion mit einer Fragmentgröße von etwa 6—10 kb zur Ligation mit dem Vektor pJC1 eingesetzt. Dazu wurde der Vektor pJC1 mit BamHI linearisiert und dephosphoryliert. Fünf ng davon wurde mit 20 ng der chromosomalen 6—10 kb Fragmente ligiert. Mit dem gesamten Ligationsansatz wurde die exportdefekte Mutante NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021—4027) durch Elektroporation (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299—304) transformiert. Die Transformanten wurden auf LBHIS (FEMS Microbiol Lett (1989) 65: 299—304) mit 15 µg Kanamycin pro ml selektioniert. Diese Transformanten wurden umfangreichen Plasmidanalysen unterzogen, indem 200 der insgesamt 4500 erhaltenen Klone einzeln angezogen, und deren Plasmidanteil und -größe bestimmt wurden. Im Durchschnitt trug etwa die Hälfte der untersuchten Kanamycin-resistenten Klone ein rekombinantes Plasmid mit einem Insert der durchschnittlichen Größe von 8 kb. Damit ergibt sich eine Wahrscheinlichkeit von 0,96 für die Anwesenheit jedes beliebigen Gens aus *C. glutamicum* in der errichteten Genbank. Die 4500 erhaltenen Transformanten wurden alle einzeln auf Wiedererhalt der Lysinsekretion geprüft. Dazu wurde das von Vrljic beschriebene System zur Induktion der L-Lysinausscheidung in *Corynebacterium glutamicum* eingesetzt (J Bacteriol (1995) 177: 4021—4027). Dazu wurden sogenannte Minimalmedium-Indikatorplatten hergestellt, die pro Liter 20 g (NH₄)₂SO₄, 5 g Harnstoff, 1 g KH₂PO₄, 1 g K₂HPO₄, 0,25 g MgSO₄ × 7 H₂O, 42 g Morpholinopropansulfonsäure, 1 ml CaCl₂ (1 g/100 ml), 750 ml dest., 1 ml Cg-Spuren-salze, 1 ml Biotin (20 mg/100 ml), pH 7, 4% Glukose 1,8 mg Protokatechusäure, 1 mg FeSO₄ × 7 H₂O, 1 mg MnSO₄ × H₂O, 0,1 mg ZnSO₄ × 7 H₂O, 0,02 mg CuSO₄, 0,002 mg NiCl₂ × 6 H₂O, 20 g Agar-Agar, sowie 10⁷ Zellen/ml der Lysin-autotrophen *C. glutamicum* Mutante 49/3 enthielten. Die ursprünglichen 4500 Transformanten wurden alle einzeln mittels Zahnstocher auf die Indikatorplatten gepickt, mit jeweils einer Kontrolle des ursprünglichen Nichtausscheiders NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021—4027) und des Ausgangstammes R127. Parallel wurden jeweils 2 Platten beimpft, von denen nur eine zusätzlich 5 mM L-Methionin enthielt, um so die Lysinausscheidung zu induzieren. Die Indikatorplatten wurden bei 30°C inkubiert, und nach 15, 24 und 48 Stunden untersucht. Insgesamt wurden so 29 Klone erhalten, die auf der mit Methionin versetzten Indikatorplatte einen Wachstumshof durch den Induktionsstamm 49/3 zeigten. Die Klone wurden vereinzelt, und dann erneut, wie oben beschrieben, auf Wiedererhalt des Wachstumshofs geprüft. Auf diese Weise wurden die zwei Klone NA8 pMV8-5-24 und NA8 pMV6-3 erhalten, die die Fähigkeit wiedererhalten hatten, Lysin auszusecheiden.

Von diesen Klönen wurden Plasmidpräparationen, wie bei Schwarzer et al. (Bio/Technology (1990) 9: 84—87) beschrieben, durchgeführt. Durch Retransformation in NA8 wurde der plasmidgebundene Effekt der Ausscheidung von L-Lysin bestätigt. Beide Plasmide wurden einer Restriktionsanalyse unterzogen. Plasmid pMV8-5-24 trägt ein Insert von 8,3 kb, und pMV6-3 eines von 9,5 kb. Die physikalische Kartierung der Inserts zeigt Fig. 1.

b) Subklonierung eines DNA-Fragments, das den Lysinexport rekonstituiert

Vom Insert des Plasmids pMV6-3 wurden unter Nutzung der bestimmten Restriktionschnittstellen einzelne Subklone hergestellt. So wurde das 3,7 kb XhoI-SalI-Fragment, das 2,3 kb BamHI-Fragment und das 7,2 kb BamHI-Fragment mit dem entsprechend geschnittenem und behandeltem Vektor pJC1 (Mol Gen Genet (1990)

DE 195 48 222 A1

220: 478—480) ligiert. Mit den Ligationsprodukten wurde direkt *C. glutamicum* NA8 transformiert, die Transformanten wie oben beschrieben auf Wiedererhalt der Lysinausscheidung geprüft und die Anwesenheit des Subklons durch Plasmidpräparation und Restriktionsanalyse bestätigt. Auf diese Weise wurde als kleinster Subklon der Stamm mit Plasmid pMV2-3 erhalten (Fig. 1). Dieses, den Lysinexport vermittelnde Fragment enthält als Insert das 2,3 kb BamHI-Fragment aus pMV6-3.

c) Sequenz des Lysinexportgens *lysE* und dessen Regulators *lysG*

Die Nukleotidsequenz des 2,3 kb BamHI-Fragments wurde nach der Dideoxy-Kettenabbruch-Methode von Sanger et al. durchgeführt (Proc Natl Acad Sci USA (1977) 74: 5463—5467), und die Sequenzierungsreaktionen mit dem AutoRead Sequencing kit von Pharmacia (Uppsala, Sweden). Die elektrophoretische Analyse erfolgte mit dem automatischen Laser-Fluoreszenz DNA Sequenziergerät (ALF) von Pharmacia-LKB (Piscataway, NJ, USA). Die erhaltene Nukleotidsequenz wurde mit dem Programmpaket HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) analysiert. Die Nukleotidsequenz und das Ergebnis der Analyse ist in Tabelle 2 wiedergegeben. Die Analyse ergibt zwei vollständige offene Leseraster (ORF) auf dem sequenzierten DNA-Stück. ORF1 kodiert für ein Protein mit einer Länge von 236 Aminosäuren, ORF2 für eins mit einer Länge von 290 Aminosäuren. Das von ORF1 abgeleitete Protein zeigt eine Häufung hydrophober Aminosäuren, wie sie für membranständige Proteine charakteristisch ist. Die detaillierte Analyse der Verteilung der hydrophoben und hydrophilen Aminosäuren mit dem Programm PHD.HTM (Protein Science (1995) 4: 521—533) ist in Tabelle 3 gezeigt. Daraus ergibt sich, daß das Protein sechs hydrophobe Helixbereiche enthält, die die Membran durchqueren. Damit handelt es sich bei diesem Protein um den gesuchten Exporter der Aminosäure L-Lysin. Das entsprechende Gen wird deswegen im Folgenden als *lysE* bezeichnet. Es ist entsprechend in Tabelle 2 markiert. ORF2 wird in Gegenrichtung zu ORF1 transkribiert. Die Sequenzanalyse zeigt, daß ORF2 hohe Identität mit Regulatorgenen hat, die als eine Familie zusammengefaßt werden (Ann Rev Microbiol (1993) 597—626). Gene dieser Familie regulieren die Expression der verschiedensten an katabolen oder anabolen Prozessen beteiligter Gene in positiver Weise. Im Folgenden wird ORF2 deswegen als *lysG* (Govern = Regulieren) bezeichnet. Wegen dieser Zuordnung, und weil *lysE* nur zusammen mit *lysG* kloniert (siehe a)) und subkloniert werden konnte (siehe b)), ist *lysE* Regulator von *lysE* und somit ebenfalls am Lysinexport beteiligt. Das Gen *lysG* und dessen abgeleitete Aminosäuresequenz sind ebenfalls in Tabelle 2 bzw. Tabelle 1 gezeigt.

d) Identifizierung eines unbekannten Membranproteins aus *Escherichia coli* durch Sequenzvergleich

Mit den etablierten Sequenzen gemäß Tabelle 3 können bereits existierende Sequenzbanken durchsucht werden, um so den von sequenzierten Bereichen abgeleiteten Proteinen eine Funktion zuzunordnen. Entsprechend wurde die Aminosäuresequenz des Lysinexporters aus *C. glutamicum* unter Zuhilfenahme des Programmpakets HUSAR (Release 3.0) des Deutschen Krebsforschungszentrums (Heidelberg) mit abgeleiteten Proteinsequenzen aller dort deponierten DNA-Sequenzen verglichen. Zu einer einzigen Sequenz bisher unbekannter Funktion aus *E. coli* ergab sich eine hohe Homologie von 39,3% identischen Aminosäuren, und 64,9% ähnlichen Aminosäuren. Der Vergleich ist in Fig. 2 gezeigt. Das bislang nicht charakterisierte offene Leseraster aus *E. coli* ist über dieses Verfahren damit als ein Aminosäureexportgen identifiziert.

e) Gesteigerter Export intrazellulär akkumulierten L-Lysins

Der Stamm *C. glutamicum* NA8 (J Bacteriol (1995) 177: 4021—4027) wurde mit Plasmid pMV2-3 transformiert, und die L-Lysinausscheidung der Stämme verglichen. Dazu wurden NA8 und NA8pMV2-3 in Komplexmedium wie bei Vrljic et al. (J Bacteriol (1995) 177: 4021—4027) beschrieben angezogen, und das Fermentationsmedium CGXII (J Bacteriol (1993) 175: 5595—5603) jeweils getrennt beimpft. Das Medium enthält zusätzlich 5 mM L-Methionin, um die intrazelluläre L-Lysinbiosynthese zu induzieren. Nach Kultivierung für 24 Stunden bei 30°C auf dem Rotationsschüttler bei 140 Upm wurde zellinterne und externe L-Lysinbestimmungen durchgeführt. Zur zellinternen Bestimmung wurden Silikonölzentrifugationen durchgeführt (Methods Enzymology LV (1979) 547—567); die Bestimmung der Aminosäuren erfolgte mittels Hochdruckflüssigchromatografie (J Chromat (1983) 266: 471—482). Diese Bestimmungen wurden zu verschiedenen Zeiten, wie in Fig. 3 angegeben, durchgeführt. Entsprechend dem benutzten Verfahren wird das angestaute zellinterne L-Lysin also durch pMV2-3 vermehrt ausgeschieden und akkumuliert. Entsprechend ist erwartungsgemäß auch das zellintern vorhandene L-Lysin stark reduziert. Somit stellt die Nutzung des entdeckten und beschriebenen Exporters ein Verfahren dar, um die L-Lysinbildung entscheidend zu verbessern.

f) Gesteigerte Akkumulation von L-Lysin durch *lysE* oder *lysEG*

Vom Subclon pMV2-3, der das sequenzierte 2374 bp BamHI-Fragment in pJC1 enthält (siehe Fig. 1), wurde entsprechend der Sequenzinformation das *lysE* tragende 1173 bp PvuII-HindIII Fragment in pZ1 (Appl Env Microbiol (1989) 55: 684—688) ligiert, und so das Plasmid *plysE* erhalten. Dieses Plasmid, sowie das *lysElysG* tragende Plasmid pMV2-3 wurde durch Elektroporation in *C. glutamicum* Stamm d eingeführt, indem chromosomale Bereiche deletiert sind. Die erhaltenen Stämme *C. glutamicum* d pMV2-3, *C. glutamicum* d *plysE*, *C. glutamicum* pJC1 wurden wie unter e) beschrieben zunächst auf Komplexmedium vorgezogen, dann in Produktionsminimalmedium CGXII zusammen mit 4% Glukose und 5 mM L-Methionin kultiviert, und Proben zur Bestimmung des akkumulierten L-Lysins entnommen. Wie aus Fig. 4 ersichtlich, wird durch *lysElysG* eine Steigerung der Lysinakkumulation gegenüber der Kontrolle erreicht. Die *plysE* wird durch dieses Verfah

DE 195 48 222 A1

eine außerordentlich gesteigerte Akkumulation von 4,8 auf 13,2 mM L-lysin erreicht.

Legenden der Tabellen und Figuren:

Tabelle 1: Die Aminosäuresequenz des Lysinexporter-Regulators aus *Corynebacterium glutamicum*, mit dem für DNA-bindende Proteine typischen Helix-Turn-Helix-Motif.

5 Tabelle 2 (drei Seiten): Die Nukleotidsequenz des für den Lysinexporter und Lysinexport-Regulators codierenden Bereichs aus *C. glutamicum*.

Tabelle 3: Die Aminosäuresequenz des Lysinexporters aus *Corynebacterium glutamicum*, mit den identifizierten transmembranen Helices TMH1 bis TMH6.

10 Fig. 1: Die durch die Klonierung erhaltenen DNA-Fragmente in pMV6-3 und pMV8-5-24, die die Lysinsekretion bewirken, sowie der aus pMV6-3 hergestellte Subklon pMV2-3, der ebenfalls die Lysinsekretion bewirkt und sequenziert wurde. B, BamHI; S, SmaI; Sc, SacI; Sl, SalI; H, HindII; X, XhoI.

Fig. 2: Vergleich der abgeleiteten Aminosäuresequenz von LysE aus *C. glutamicum* (oben), mit einem Genprodukt bislang unbekannter Funktion aus *Escherichia coli* (unten), das dadurch als Exportcarrier identifiziert ist.

15 Fig. 3: Gesteigerter Lysinexport durch pMV2-3 mit *C. glutamicum* NA8. Oben, die Kontrolle mit geringer Ausscheidung und zellinternem Anstau von Lysin bis etwa 150 mM. Unten die durch pMV2-3 bewirkte hohe Ausscheidung mit zellinternem nur geringem Anstau von etwa 30 mM.

Fig. 4: Die Steigerung der Lysinakkumulation in *C. glutamicum* durch lysElysG (pMV2-3) (mittlere Kurve), und die durch lysE (plysE) bedingte Akkumulation (obere Kurve).

20
25
30
35
40
45
50
55
60
65

1 MNPIQLDTLL SIIDEGSEEG ASLAISISPS AVSORVKALE HHVGRVLEVS
 51 TOPAKATEAG EVLVOAARKM VLLOAETKQ LSGRLAEIPL TIAINADSL
 101 TWFPVPFNEV ASWGGATLTL RLEDEAHTLS LLRRGDVLGA VTREANFVAG
 151 CEVVELGTMR HLAIAATPSLR DAYMVDGKLD WAAMPVLREG PKDVLQDRDL
 201 DGRVDGPVGR RRVSIIVPSAE GFGEAIRRGL GWGLLPETQA APMLKAGEVI
 251 LLDEIPIDTP MYQWRWRLES RSLARLTDV VDAIEGLRP

Helix-Turn-Helix-Motiv

DE 195 48 222 A1

GGTAAACGACTTCCACANTGAGACGGACCGGGTTAAGGACGCCCGCTTCTTCACTTTTIG 60
GGACTTGGAAAAGTCTTCATTGATTCGGCGTTAGGGAGCTAACGACGTAGTTGCTGCCG 120
/LysG
- P R L G E I A A D V V A 5
CAGACACTCAGATCGATCTCTAGATCTAAGGTCCGCGGTAGCAACGGTTATGTAGCCACA 180
D T L R A L S R S E L R W R Q W Y M P T 10
CAGTTACCCATAGAGTAGCTCCTCCTAGTGAAGAGGACGAAATCGTACCCTCGTCAAC 240
D I P I E D L L I V E G A K L M P A A Q
CCAAAGCCCTTCTTCAGGGGTGGTTCCGGAGCCGCTTAACGGAGTGGTTTGAAGGCG 300
T E P L L G W G L G R R I A E G F G E A 15
GCTGCCCTGTACCTATGCCCGGACGCGGGGTGTCTGGTAGCTGCCGGGGCAGGTCCAG 360
S P V I S V R R R G V P G D V R G D L D
TGCCGGAAGTTCGTGTAGAAACCTTGGCTTCGCATTCTGCCCGTAGCGTGGGGTTAGATC 420
R D Q L V D K P G F R L V P M A A W D L 20
AAAGGGTAGTTGGTACATCCGTAGGGCGTTACTCCCCAACGTTACCGGTTACCGCGTA 480
K G D V M Y A D R L S P T A I A L H R M 25
CCAAGGTTCAAGATGATGAAGTGTAGGGCGGTGCCCTAATCGAAGTGCCCAATGGCGAGG 540
T G L E V V E C G A V P N A E R T V A G
ATTTTGTAGAGGTGCCGCGTCTTCTATTACACACGCGAAGTAGAAGGTTCCGCTCGCA 600
L V D G R R L L S L T H A E D E L R L T 30
CTCGCAACGAGGTGGGGTTCTTCGATGGAGCAACTTGTGCCCTCCTTTGGTACACCTATC 660
L T A G G W S A V E N F V P P F W T S L 35
GCTTAGACGCAACTACCGCTACCAATTGCCCTAAGTCGTTCCGCGAGGTCTATCAACGCG 720
S D A N I A I T L P I E A L R G S L Q A
AAATCAAGACGAACGTCGTTGTGGTAAAGGCGCGACGAACGTGTTCTTGAGTGGGCG 780
K T E A Q L L V M K R A A Q V L V E G A 40
AAGCCAACGAACCGCCCAACCCACGCGCTATGTTGTGAGCTGGGTGCACTACGAGCTC 840
E T A K A P Q T R S V L V R G V H H E L 45
TCGAAATTGCGGACTGAGTGGCGGCTCCCCCTTACCTTCCCGATTCTCCGCGGAAG 900
A K V R Q S V A S P S I S L A L S A G E
50
55
60
65

DE 195 48 222 A1

5 960
CTTCGACGGAAGTAGTTACTAACTCTCGTTTCACAGGTCACCTTACCCCRAGTA-----S
S'---TGCCTTCATCAATGATTGAGRGCAAGGTGTCCAGTTGAATGGGGTTCATGAAGCT
F S G E D I I S L L T D L Q I P N M

10 1020
ATATTAAACCATGTTAAGAACCAATCATTTTACTTAAGTACTTCCATAGGTCACGATGGT
M V
/Lyse->

15 1080
GATCATGGAAATCTTCATTACAGGTCGTCTTTTGGGGGCCAGTCTTTTACTGTCCATCGG
I M E I F I T G L L L G A S L L L S I G

20 1140
ACCGCAGAAIGTACTGGTGATTAAACAAGGAATTAAGCGCGAAGGACTCATTTGCGGTTCT
P Q N V L V I K Q G I K R E G L I A V L

25 1200
TCTCGTGTGTTTAAATTTCTGACGTCCTTTTGTTCATCGCCGGGCACCTTGGGCGTTGATCT
L V C L I S D V F L F I A G T L G V D L

30 1260
TTTGCCCAATGCCGCGCCGATCGTGCTCGATATTATGCGCTGGGGTGGCATCGCTTACCT
L S N A A P I V L D I M R W G G I A Y L

35 1320
GTTATGGTTTGCCGTCATGGCAGCGAAAGACGCCATGACAAACAAGGTGGAAGCGCCACA
L W F A V M A A K D A M T N K V E A P Q

40 1380
GATCATTGAAGAACAGAACCAACCGTGCCCGATGACACGCTTTTGGGCGGTTCCGGCGGT
I I E E T E P T V P D D T P L G G S A V

45 1440
GGCCACTGACACCGCAACCGGGTGGCGGTGGAGGTGAGCGTGGATAAGCAGCGGGTTTG
A T D T R N R V R V E V S V D K Q R V W

50 1500
GGTAAGCCCATGTTGATGGCAATCGTGCTGACCTGGTTGAACCCGATGCGTATTGGA
V K P M L M A I V L T W L N P N A Y L D

55 1560
CGCGTTTGTGTTTATCGGCGGCGTCCGGCGGCAATACGGCGACACCGGACGGTGGATTTT
A P V F I G G V G A Q Y G D T G R W I F

60 1620
CGCCGCTGGCGGTTGGCGGCAAGCCTGATCTGGTTCCCGCTGGTGGGTTTCGGCGCAGC
A A G A F A A S L I W F P L V G F G A A

65 1680
AGCATGTGCACGCCGCTGTCCAGCCCCAAGGTGTGGCGGTGGATCAACGTCGTGGC
A L S R P L S S P K V W R W I N V V V A

Tabelle 2 (fortgesetzt)

DE 195 48 222 A1

1740
 / ~~oxf3~~
 - N E R T K
 5' CTACTGGCGTACCGGTAGTTTGACTACAAGTACCCCAATCAAAGCGCCCAAAA
 AGTTGTGATGACCGCATTGGCCATCAAACCTGATGTTGATGGGTAGTTTTCGCGG 5'
 V V M T A L A I K L M L M G -
 LysE /

1800
 CCTTAGCCACCGGAAGCGGGTTTACAACTACGGCCGCGAGCACCCCTTAGAGTAGCTAGCG
 S D T A K A W I N I G A D H S I E D I A

1860
 GAGGTTGAGCCGAGTCCTTTGAGGTTCAACAACCTCACTTAGTTCGACACACAGGTGAC
 E L E A D S F E L N N L S D L S N D L Q

1920
 GAGTTGACTGCTTCGTGGTTAGTTACGTGACCAAGTGCCATAGCGCGGCATGAGAGGAAC
 E V S S A G I L A S T V T D A G Y E G Q

1980
 GAGCGCGTCGTGGGTACGTTCCGGGTAGACGCGTTCACTGACGGGCGCAAGGACCCGCTA
 E R L V W A L A M Q A L S Q G R E Q A I

2040
 CAGTAACTCGAAGCCCTGGTATAGTTATAACAAGTGCAAGTTGTACGGGAGTCTGTCCCT
 D N L K R V M D I N N V N L M G E S L S

2100
 GAATGGGACCGACCGCGCCCTTGGGAGACCTTAAGGTAGCTCTATAAACAGGCACCTCGTC
 K G Q S A R S G E P I G D L Y K D T L L

2160
 CGGGACCGGTTCAACCACTCTTTCGTTACTGCGGTTCTGGTAAACCGTCCGACTGACGT
 G Q A L P S F A I V G L G N H A A S Q L

2220
 GTTCAAGAGTGGCAGTAGCGGGCCAGGAGGTGGGTTGCTAATTACTACCTTATCGAACC
 L N E G D D G E E E V W R N I I S Y S P

2280
 GACTACTTAGTCTTCGCCCGTCCGGAGGAGGCGGTACTTGAGTCCGGCGGAGCGGACATC
 Q H I L L P C G E E A M F E A A E A T L

2340
 GAGACCTGGCATCCTTCTTTATGGGTGCAATTTCTCGGAAGGTCGTGCGTTGTTACAGTGC
 E P G Y S S I G V Y L A K G S A V I D R

2374
 < ~~oxf3~~ /
 GTTACGCATGTACCAAGAAGGTTTCCTCATAGA
 L A Y H T E E L P T D

Tabelle 2 (fortgesetzt)

DE 195 48 222 A1

1 MVIMEIFITG LLLGASLLS IGPNVLVIK QGIKREGLIA VLLVCLISDV TMH1
 51 FLFIAGTLGV DLSNAAPIV LDIMRWGGIA YLLWEAVMAA KDAMTNKVEA TMH2
 101 PQIEETEPT VPDDTPLGGS AVATDTRNRV RVEVSVDKOR VVVKPMLMAI TMH3
 151 VLITWLNPNAY LDAFVFIGGV GAQYGDGTGRW IFAAGAFPAAS LIWEPLVGEF TMH4
 201 AAALSRPLSS PKVWRWINVV VAVVMTALAI KLMLMG TMH5
 TMH6

Patentansprüche

1. Verfahren zur mikrobiellen Herstellung von Aminosäuren, bei dem die Exportcarrier-Aktivität und/oder die Exportgen-Expression eines die entsprechende Aminosäure produzierenden Mikroorganismus erhöht wird.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die endogene Exportcarrier-Aktivität des Mikroorganismus erhöht wird.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß durch Mutation des endogenen Exportgens ein Carrier mit höherer Export-Aktivität erzeugt wird.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Genexpression des Exportcarriers durch Erhöhen der Genkopienzahl erhöht wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß zur Erhöhung der Genkopienzahl das Exportgen in ein Genkonstrukt eingebaut wird.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß das Exportgen in einen Vektor mit niedriger Kopienzahl eingebaut wird.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Exportgen in ein Genkonstrukt eingebaut wird, das dem Exportgen zugeordnete regulatorische Gensequenzen enthält.
8. Verfahren nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Gensequenz eine für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz aufweist.

DE 195 48 222 A1

9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Gensequenz eine Nukleotidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkende DNA-Sequenz aufweist.
10. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 bis 9, dadurch gekennzeichnet, daß ein die entsprechende Aminosäure produzierender Mikroorganismus mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird. 5
11. Verfahren nach Anspruch 10, dadurch gekennzeichnet, daß ein Mikroorganismus der Gattung *Corynebacterium* mit dem das Exportgen enthaltende Genkonstrukt transformiert wird.
12. Verfahren nach Anspruch 10 oder 11, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, in dem die an der Synthese der entsprechenden Aminosäure beteiligten Enzyme 10 dereguliert sind.
13. Verfahren nach einem der Ansprüche 10 bis 12, dadurch gekennzeichnet, daß für die Transformation ein Mikroorganismus eingesetzt wird, der einen erhöhten Anteil an Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
14. Verfahren nach einem der Ansprüche 4 bis 13, dadurch gekennzeichnet, daß das Exportgen aus einem Mikroorganismen-Stamm der Gattung *Corynebacterium* isoliert wird. 15
15. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Exportgensequenz durch Vergleich mit der Sequenz eines bereits bekannten Exportgens identifiziert wird.
16. Verfahren nach Anspruch 15, dadurch gekennzeichnet, daß die von der zu identifizierenden Exportgensequenz abgeleitete Aminosäuresequenz mit der in Tabelle 3 angegebenen Aminosäuresequenz oder deren Allelvariationen verglichen wird. 20
17. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß die Exportgen-Expression durch Verstärkung der Transkriptionssignale erhöht wird.
18. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, daß als Exportgen ein Gen mit einer für die in Tabelle 3 angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz eingesetzt wird. 25
19. Verfahren nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß als Exportgen ein Gen mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz eingesetzt wird.
20. Verfahren nach einem der vorhergehenden Ansprüche zur Herstellung von L-Lysin.
21. Für einen Aminosäure-Exportcarrier kodierendes Exportgen. 30
22. Exportgen nach Anspruch 21 mit einer für die in Tabelle 3 angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz.
23. Exportgen nach Anspruch 22 mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 1016 bis 1725 gemäß Tabelle 2 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz.
24. Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 23 mit diesem zugeordneten regulatorischen Gensequenzen. 35
25. Exportgen nach Anspruch 24, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Gensequenz eine für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen kodierende Nukleotidsequenz aufweist.
26. Exportgen nach Anspruch 25, dadurch gekennzeichnet, daß die regulatorische Gensequenz eine Nukleotidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder eine im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz aufweist. 40
27. Zur Regulation eines für einen Aminosäure-Exportcarrier kodierenden Exportgens geeignetes Regulatorgen mit einer für die in Tabelle 1 angegebene Aminosäuresequenz und deren Allelvariationen kodierenden Nukleotidsequenz. 45
28. Regulatorgen nach Anspruch 27 mit der Nukleotidsequenz von Nukleotid 954 bis 82 gemäß Tabelle 2 oder einer im wesentlichen gleichwirkenden DNA-Sequenz.
29. Genstruktur, enthaltend ein Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 26.
30. Genstruktur, enthaltend eine regulatorische Gensequenz nach Anspruch 27 oder 28.
31. Vektor, enthaltend ein Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 26 oder eine Genstruktur nach Anspruch 29. 50
32. Vektor nach Anspruch 31 mit niedriger Kopienzahl.
33. Vektor, enthaltend eine regulatorische Gensequenz nach Anspruch 27 oder 28 oder eine Genstruktur nach Anspruch 30.
34. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form ein Exportgen nach einem der Ansprüche 21 bis 26 oder eine Genstruktur nach Anspruch 29. 55
35. Transformierte Zelle nach Anspruch 34, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 31 oder 32.
36. Transformierte Zelle nach Anspruch 34 oder 35, dadurch gekennzeichnet, daß sie der Gattung *Corynebacterium* angehört.
37. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 34 bis 36, dadurch gekennzeichnet, daß in dieser die an der Synthese beteiligten Enzyme der Aminosäure, die mittels des Exportcarriers, für das in die transformierte Zelle übertragene Exportgen kodiert, aus der Zelle ausgeschleust wird, dereguliert sind. 60
38. Transformierte Zelle nach einem der Ansprüche 34 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß sie einen erhöhten Anteil an Zentralstoffwechselmetaboliten enthält.
39. Transformierte Zelle, enthaltend in replizierbarer Form eine regulatorische Gensequenz nach Anspruch 27 oder 28 oder eine Genstruktur nach Anspruch 30. 65
40. Transformierte Zelle nach Anspruch 39, enthaltend einen Vektor nach Anspruch 33.
41. Für den Export von Aminosäuren geeignete Membranproteine mit 6 transmembranen Melices.

DE 195 48 222 A1

42. Membranprotein nach Anspruch 41 mit der in Tabelle 3 angegebenen Aminosäuresequenz, wobei Tabelle 3 Bestandteil dieses Anspruches ist.

43. Verwendung eines Exportgens zur Steigerung der Aminosäureproduktion von Mikroorganismen.

5 44. Verwendung nach Anspruch 43, dadurch gekennzeichnet, daß ein mutiertes Exportgen, das für ein Enzym mit erhöhter Exportcarrier-Aktivität kodiert, verwendet wird.

45. Verwendung nach Anspruch 43 oder 44, dadurch gekennzeichnet, daß der Aminosäure-produzierende Mikroorganismus mit einem Genkonstrukt, das ein Exportgen enthält, transformiert wird.

46. Verwendung nach Anspruch 45, dadurch gekennzeichnet, daß das Genkonstrukt zusätzlich regulatorische Gensequenzen trägt.

10 47. Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 46, dadurch gekennzeichnet, daß ein Exportgen aus *Corynebacterium* verwendet wird.

48. Verwendung nach einem der Ansprüche 43 bis 47, dadurch gekennzeichnet, daß als Aminosäure-produzierender Mikroorganismus *Corynebacterium* verwendet wird.

15 Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ZEICHNUNGEN SEITE 1

Nummer:

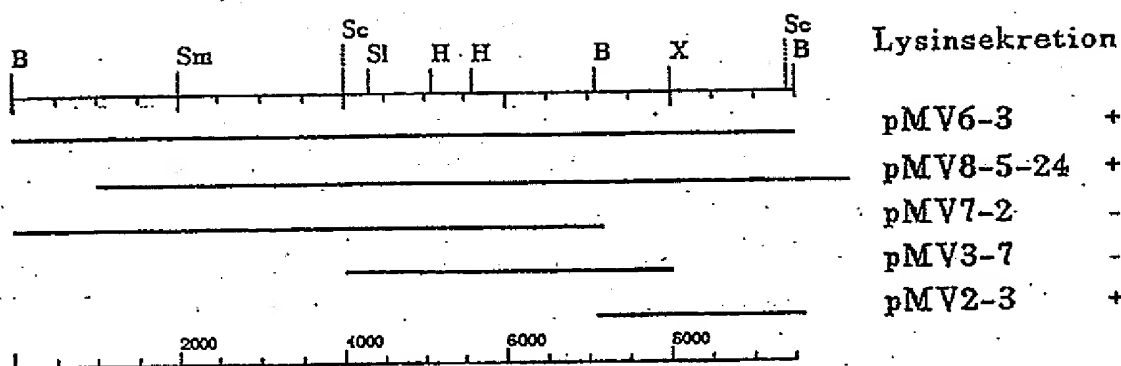
DE 195 48 222 A1

Int. Cl. 6:

C 12 N 15/67

Offenlegungstag:

26. Juni 1997



Figur 1.

ZEICHNUNGEN SEITE 2

Nummer:

DE 195 48 222 A1

Int. Cl.⁸:

C 12 N 15/67

Offenlegungstag:

26. Juni 1997

CgLyse 1 MVIMEIFITGLLLGASLLLSIGPONVLVIKOGIKREGLIAVLLVCLISDV 50
 EcYgga 1MILPLGPQNAFVMNQGI RRQYHIMIALLCALSDL 34

 CgLyse 51 FLFIAGTLGVDLLSNAAPIVLDIMRWGGIAYLLWFAVMAAKDAMTNKVEA 100
 EcYgga 35 VLICAGIFGGSALLMQSPWLLALVTWGGVAFLLWYGFAGFTAMSSNIE. 83

 CgLyse 101 POIIEETEPTVPDDTPLGGSATDTRNRVRVEVSVDKQRVWVKPMLMAI 150
 EcYgga 84LASAEVMKQGRWK.....IIATMLAV 104

 CgLyse 151 VLTWLNPNAYLDAFVFIGGVGAQYGDTRWIFAAGAFASLIWTFPLVGFG 200
 EcYgga 105 ..TWNPHVYLDTFVVLGSLGGQLDVEPKRWFALGTISASFLWFFGLALL 152

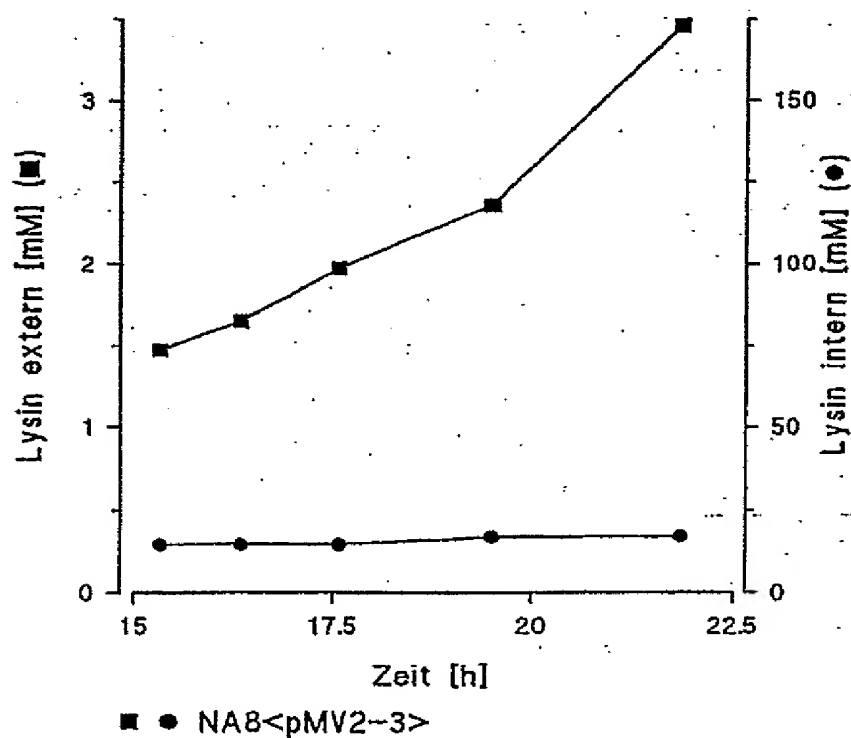
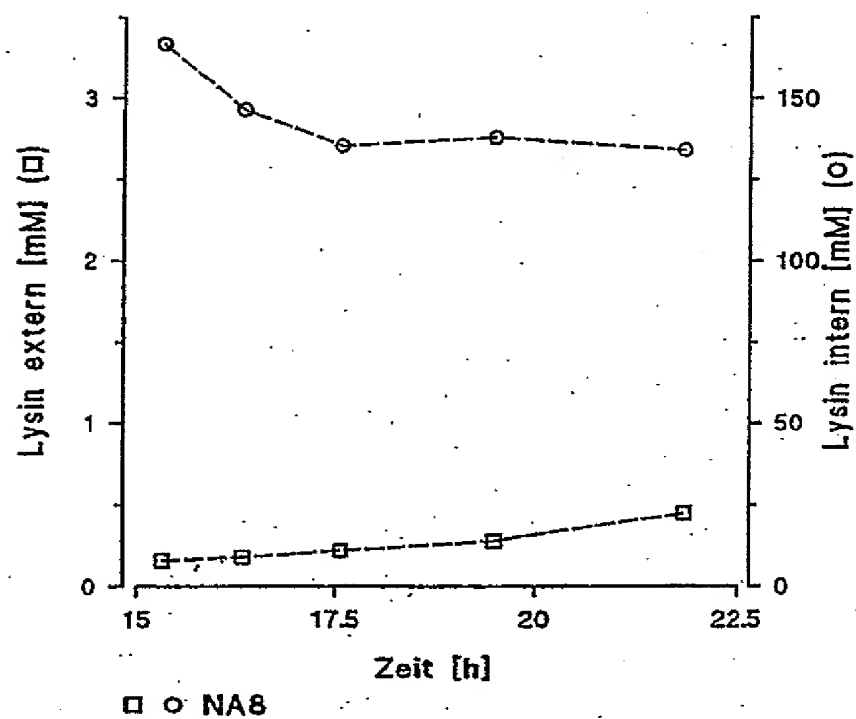
 CgLyse 201 AAALSRLSSPKVWRWINVVAVVMTALAIKMLMG..... 236
 EcYgga 153 AAWLAPRLRTAKAQRIINLVVGCVMWFIALQLARDGIAHAQALFS 197

Figur 2

ZEICHNUNGEN SEITE 3

Nummer:
Int. Cl.⁶:
Offenlegungstag:DE 195 48 222 A1
C 12 N 15/67
26. Juni 1997

Komplementation des Exportdefektes



Figur 3

ZEICHNUNGEN SEITE 4

Nummer:

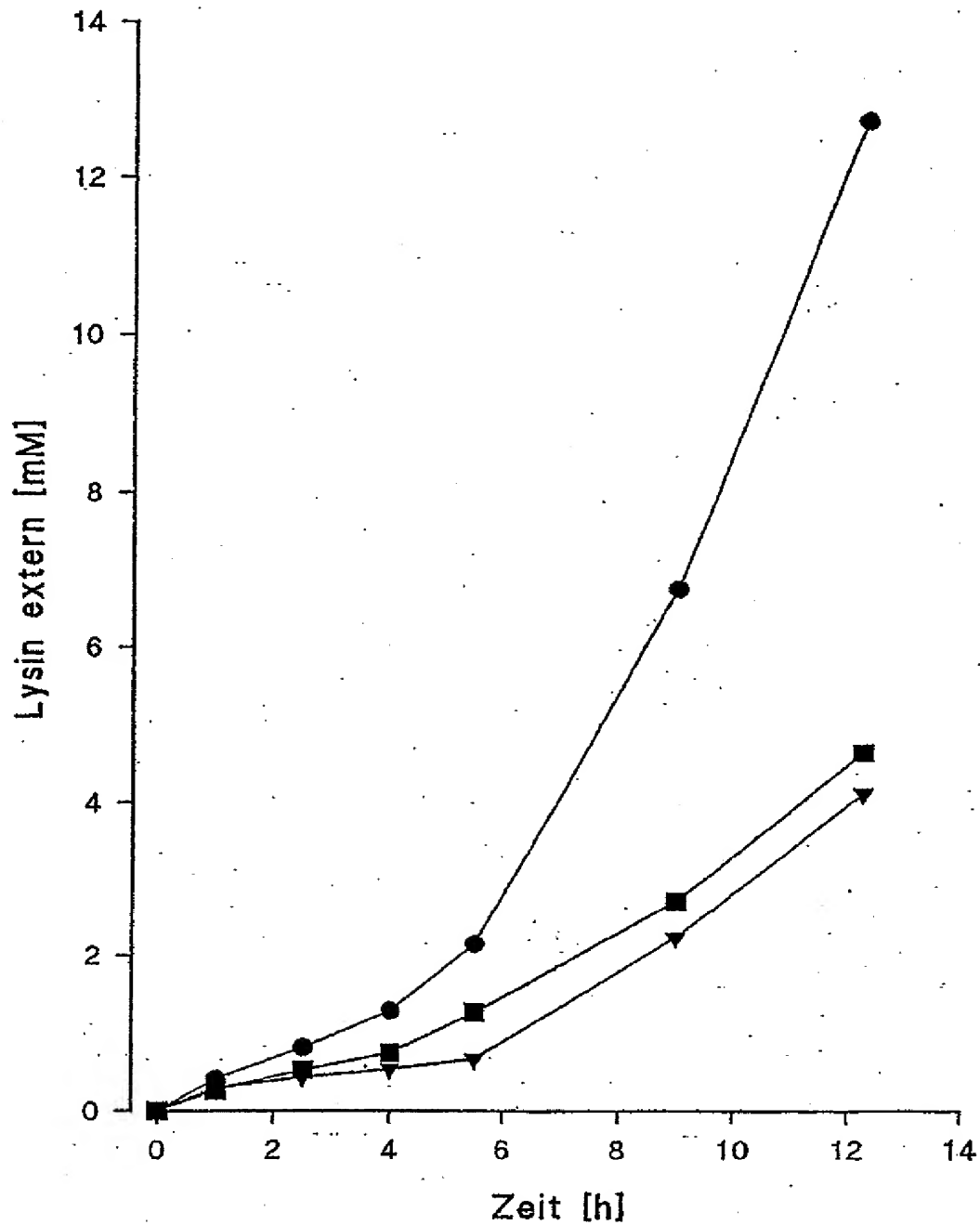
DE 195 48 222 A1

Int. Cl.:

C 12 N 15/67

Offenlegungstag:

26. Juni 1997



Figur 4